

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

VC-102:

•
Kas
ATG

1 28
G L A A Y P T E T T Y V A L L Y S G L A A L A G L A A L A L Y S L Y T Y T T A A S A L L A G I Y L I S S E S
C L A G C C C A T A T O T A A L C A G C A A A L C C T A A A L A A T T T A A T C A G C T A T T C A
178

AspValIleAlaSerAsnGlyThrLeuPheLeuGlyPheLeuLysAsnTrpLysGluGluSer

68

IsopArgylTyrIleMetGlnSerGluIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysAsnPhe
GAGCAGAAATATACCTGACGGCAATTGTCTGCTCTACTGCACTCTTTGAAAACTTT

86
 LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGlnThrIleLysGlnAspMetIleValIle
 AAGATGACCTCAGCCTCTCCAAAGCTGTCTGACCATCAGGAGACATGAATGTCAAG

100

PhoPhaAsnSerAsnLysLysLysArgAspArgPhoGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTCTATTGCGACGAAAGGAACTGATGACTCGAAAGCTGACTAATTATTCGTA

120
TAAAspLeuAsaValGlnArgLyAlaIleHisGluLeuIleGlnValMetAlaGlnLeu
ACTGATCTGAATGCTGCAAGCCAAACCAATTCATGAAGTCATCCAACTGATGCGCTCAACTG

123
SERTTOLLEALLALYSTARGLYLYALRGLYALRGYERLEU
TCCCTACCACTAALACAGCCAGCTAALACAGCTC TAG
174

(以下全自)

3. 以下 アミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする DNA 配列:

0
140
170

2 30
G L A A G P P R T Y T V A L L Y S G I A A A G I A A A L O L Y S L Y T T P S A L A A A G I Y L I S S E R
C A G A C C C A T A T G T A A A A A C C A A A A C T T A G A A A T A T T T A A T C A G O T C A T T C A
178

48
 AAGVALLIALAAGPAGAGIYTRALAAAGALAGAGIYIILAGAGIYAGAGIYLYAGAGIYAGAGIY
 GATGACAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIYAGAGIY

AspArgLysIleMetGlnSerGlnIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysAsnPhe 66
GACACAAAAATAATGCACAGCCAAATTGTCTCTTTTACTTCAACTTTTAAAACTTT

LysAspAspGlaSerHisGluLysSerValGluThrIleLysGluAspMetAsnValLys
 AACATCACTACAGCCATCCAAAGACTGTGTGACCACTACAGGACATGAAATGTCAAG

100

PhePheLeuValSerHisLysLysLysLysArgAspArgPheGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTCTAATACCAACCAACCAACCAACCATCTTCGAAAGCTGAATAATTATCCGTA

ThraspLeuAsnValGlaIArgLysAlaIleHisLeuLeu=IleGlnValMetAlaGluLeu
ACTGACTGTAAGTCGACAGCAGACGATGATGACTGATGCAAGTCATGCGCTCAACTG

113
 SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
 TCCACGACGCTAAACAGTAAGCCAAAACGATCTC P10
 114

(以下全白)

3807921 FDNA:

0
Not
ATG

1 20
G L A S P T T C T T T A L L Y S G L A L A G L A S A L E N L Y S L Y S T Y F D A L S A L A G L Y K I S S E F
C A G A C C C A L A S T A A A C A A G C A C A A A A C C T T A G C A A A T A T T A A T C C A C C T A T T C A
178

40
 AspValAlaAspArgGlyThr-LeuHisLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGluSer
 GAGTACGGGATAATGGAACTCTTCACCCATTTCAGCAATTCGAAGACGACAGT

AspArgLysIleMetGlnsargGlnIleValserPheTy-PheLysIleuPheLysIleuPhe
GACGAGAAATATATCTCAGCCGAAATCTCTTTTAACTTCAACTTTTAAAACTTT

80
LysAspAspGlnSerIleGlaLysSerValGluThrIleLysGluAspMetLysValIle:
AAGATGACCAAGCACTTCTTAAAGAGTGTCTGAGCCATCAGCAAGACATCAATCTCAAG

100

ThePhalsnsarlnlysllysylargaspaspheGluLysLeuThrAsnTyr::Val
-----CCTGGCGAGGACGATGCTTCCTTGCAAGCTGACTAATAATCCGTAA

130
TThAsPLeuArVaIdGzargLyalaIleIscIuLeuIleGlaValMetIleGluLeu
ACTACTGAAATGTCTACCCAGCACTACATGACTCATCTAGTGTATCTCTACTCTG

133
SerProIleAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TCCGACGACCTAATTCAGCGAAGCTAATTCAGCTCT TAG
714

(上天下年日)

4. 請求項3に記載のプラスミドDNAを調製する方法であって、

図記5' 非翻訳領域ならびに1194bpおよび143bpのアミノ酸をもったcDNAのコード領域の一部が制限エンドヌクレアーゼによる開裂によって取り除かれ、そして、図記3' 非翻訳領域およびcDNAのコード領域の一部もまた制限エンドヌクレアーゼによる開裂によって取り除かれ、そして、プラスミドにおけるこの遺伝子がバクテリア細胞に導入される、方法。

5. 前記バクテリア細胞が、*E. coli*である、請求項4に記載の方法。

6. 前記プラス1が $pKK233-2$ である、請求項4および5に記載の方法。

7. 前記5'領域およびリーダー配列の調製のために使用された制限エンドヌクレアーゼが、AvaIIである、請求項4から6に記載の方法。

8. 前記3' 非翻訳領域およびコード領域の一部の編纂に使用された制限エンドヌクレアーゼが、HindIIIである、請求項4から7に記載の方法。

9. 以下の特性が随ひ付いた、請求項1に記載のポリペプチドの調製の方法であって：

8) IPN-ガソマC-10Lが請求項3に記載のプラス
IPDNAによって発現され、そして

b) うまく発現したバクテリア細胞が壊され、得られた針

入体が異身により可逆性のバクテリアタンパク質がない状態にされ、そして

c) 入体は反応によって破壊 にもたせられ次に復元工程が行われ、そして

d) インターフェュロンガンマC-10Lが精製される、方法。

10. 前記ガンマインターフェュロンがバクテラ（陽イオン交換法による）を使って精製され、次にゲル濾過によって高度に精製される、請求項9に記載の方法。

11. 前記バクテリア菌が機械的方法、例えば超音波によって破壊される、請求項9および10に記載の方法。

12. 製剤中に等しく分布するために、陽イオン交換物質を17N-ガンマC-10Lと一緒に接触させ、次に、洗浄されバクテラ法で抽出される、請求項9から11までに記載の方法。

13. 一般的に使用される陽イオン交換物質（例えば、CM-セルロースあるいはA111-Gel-Base）が使用される、方法。

14. 請求項1に記載のポリペプチドの調製における使用。

15. 請求項14に記載の調製としての使用。

16. 請求項14および15に記載のリウマチおよび腎臓病の治療のための調製としての使用。

17. 請求項1に記載のポリペプチドのインビトロ実験、例えばインターフェュロンレベルの測定、のための精密化試品

としての使用。

明 細 書

新しいヒト組み換えガンマインターフェュロン

技術分野

本発明は、ガンマインターフェュロンの新しい変異体、この変異体ガンマインターフェュロンをコードするDNA配列およびプラスミドDNAならびに医学的目的のためのこの変異体インターフェュロンの使用に関する。

背景技術

インターフェュロンは3種類に分類されている。すなわち、アルファインターフェュロン、ベータインターフェュロンそしてガンマインターフェュロンである。

特に、ガンマインターフェュロンは最近、治療薬としての使用によって重要性を増している。これは、遺伝子工学による組み換えガンマインターフェュロンの産生に成功したことによるものが殆どである。（組み換えガンマインターフェュロン）

しかしながら、医学におけるその全般的な適用ゆえに、高濃度のインターフェュロンが使用される。これらの高い濃度はインターフェュロンの処方において高い必要性がある。加えて、収率性に寄与することが出来る。もし、より高い活性を示す変異体が入手できれば、より低い濃度が治療に使用される。

従って、治療薬としてのガンマインターフェュロンの使用はより好ましいものになる。さらに、この変異体インターフェュロンは高い割合で発見されることが望まれる。

本発明の目的は144個のアミノ酸を持つ以前報告されたガンマインターフェュロンに比して高い活性を持つガンマインターフェュロンの新しい変異体を提供することである。本発明のさらに別の目的はその変異体ガンマインターフェュロンをコードするDNA配列とプラスミドDNAを提供することである。さらに本発明の別の目的は最も高い生産高が可能な変異体ガンマインターフェュロンの生産方法を提供することである。

発明の説明

前記の目的は、実際により高い活性を示す組み換えガンマインターフェュロンを生じるアミノ酸配列をコードするDNA配列およびプラスミドDNAを提供することによって解決される。この新しいポリペプチド（以下のテキストではガンマインターフェュロンC-10Lとして示す）は、134個のアミノ酸を含む。アミノ酸の1から132までは天然のガンマインターフェュロンのアミノ酸に対応する。更に3位の最初のアミノ酸が存在し、アミノ酸配列決定法によって決定される。133位のアミノ酸はグルタミンではなくてロイシンである。完全なDNAとタンパク質の配列は、図1に与えられている。同時に、変異体ガンマインターフェュロンの高

い生産高を示す方法について開示する。さらに、いわゆる「パッチ プロトコール」を備った製造法についても示す。

開くべきことは、ガンマーインターフェロンC10Lは割合に143個のアミノ酸をもつガンマーインターフェロンよりも4倍高い活性を持つことが発見された。加えて、ガンマーインターフェロンC-10Lは、ヒトM18H細胞に対して通常のガンマーインターフェロンに比べて抗増殖活性として34倍高い活性を持つ。以前から知られたガンマーインターフェロンと比較してそのより高い活性と発現割合ゆえに、これはじめて入手可能となった短くなった形のもは、ガンマーインターフェロンをより低濃度でより効果的増殖性が高い増殖量が治療目的に使用されるようになることを可能にする。高い発現割合のために、このガンマーインターフェロンを例えばインターフェロンレベル測定のための標準品として、インビトロ実験のために、精製化成品として使用することが更に可能となる。

新しい変異体とその製造の詳細な記述は、以下に示す。

ガンマーインターフェロンC-10Lの製造は、遺伝子の部分的な開裂とそれをプラスミドDNA中の開裂部位の後に置き、続いてこのDNAを受けてバクテリア細胞の形質転換を行うことによって達成される。次の段階で、ガンマーインターフェロンC10Lは陽イオン交換法をつかって分離される。そして、2番目の段階として高い純度が行われる。実施例として、ガンマーインターフェロンC-10Lをコード

するプラスミドDNA (特許番号 D6M6338号) の説明を以下に示す。

出発物質は、ヒトの細胞から簡単な方法によって調製されたcDNAを用いた。このcDNAは配列が決定され、ポリAなしに1194塩基対(bp)の長さを持つ。これは全コード領域および5'と3'の非翻訳領域を含む。183番目から574番目のヌクレオチドは発現プラスミドの構築に用いられた。

タンパク質のリーダー配列および5'非翻訳領域(1-108)は制限エンドヌクレアーゼAva⁺11(配列GGA/TCC、181-188を認識する)によって取り除かれた。開始コドンATG(ノチオニンをコードする)および最初のアミノ酸についてのコドン、合成DNA断片(市販のリンカー)を使ってcDNAの5'末端につけられた。この方法では天然のコドンCAG(グルタミンをコードする)は、CAA(これもグルタミンをコードする)に置き換わった。以上述べた技術は、「従来技術」である。

3'の非翻訳領域および一部のコード領域は、Hinf1(認識配列GANTC、571-575)による開裂によって取り除かれた。Xba1-(CTCTAGAG)認識部位のリンカーの連結は、アミノ酸133(ロイレン)に対するコドンおよび終止コドン(TAG)を提供する。短くされたcDNAは、アダプター配列を使って発現ベクターに挿入される。

なる。

本発明の用語「パッチ プロトコール」は次の過程を示すために用いられる。ガンマーインターフェロンが全てのイオン交換物質に結合するように陽イオン交換物質はガンマーインターフェロン溶液の中で保持された。そしてガンマーインターフェロンのタンパク質濃度は定められたイオン交換物質の濃度の2mg/mlよりは高くなかった。この方法は「パッチ プロトコール」と呼ばれる。次にイオン交換物質にのせたガンマーインターフェロンは、パッチ中でリン酸緩衝液で洗われ、そして次にガンマーインターフェロンは、パッチ中でリン酸緩衝液中の塩化ナトリウム溶液で抽出された。セルロースあるいはA11-blueのどちらとも陽イオン交換物質として使われる。

この「パッチ プロトコール」は決定的な利点を持ち、そして一般的なカラム法での10%と比較して精製の間に40%という生成物の増加がみられる。

このイオン交換法は普通カラムクロマトグラフィーによって実行される；例えば、0.2Mグアニジン塩化物とリン酸緩衝液の存在下での還元工程の後、ガンマーインターフェロンは陽イオン交換物質のカラムの上にくみあげられ、ガンマーインターフェロンに対する陽イオン交換物質の高い結合能によって、カラムの上部部分に対応的に高濃度で結合する。結合したガンマーインターフェロンは高濃度であるので、対応した抽出生成物は非常に少ない。すなわち、結合したイン

E. coliにおけるガンマーインターフェロンの発現のためにL. JassonおよびJ. Brosius(GENE 40, (1983)1893)によって記載されたプラスミドpKK233-2が使用された。このプラスミドは調製できるlac-プロモーター、開始コドン(ATG)およびRNAポリメラーゼに対するターミレーターを含むマルチクローニング部位を有する。

このプラスミドDNA (寄託番号DSM6238)は、ガンマーインターフェロンC-10Lの生産のための開始物質を構成する。

ガンマーインターフェロンC-10Lは、JM105バクテリア細胞で全タンパク質の30%の割合で発現する。ガンマーインターフェロンC-10Lの90%より多くは不溶性の封入体の形で存在する。

ガンマーインターフェロンの精製のためにバクテリア細胞は破壊され、封入体は繰り返し洗浄することによって可溶性のバクテリアタンパク質がない状態となった。細胞破壊は好ましくは、機械的に行った。特に、超音波が用いられた。封入体とそれについてのガンマーインターフェロンはグアニジン塩化物を使った酸性工程によって可溶化した。ガンマーインターフェロンは、リン酸緩衝液中で精製することによる還元工程で生物学的に活性な形に戻された。このようにして、「パッチ プロトコール」の陽イオン交換法によって90%より多い純度のガンマーインターフェロンが濃縮された。更に、ゲル透過工程によって純度が過み95%より多い純度と

ナーフュロンのごく一部だけが対応する塩酸版によって抽出され得る。従って、この発明による方法は健康飲料に対して決定的な利点をもつ。

図1はガンマーインターフェロンC-10L変異体のDM
Aとタンパク質の配列を示す。

このことから、ガンマーインターフェロン産生株 C-10
L は 134 個のアミノ酸を含むことが解る。最初のアミノ酸
(0 位のメチオニン) は添加物でありタンパク質配列決定法
によって確認された。1 かも 133 番目のアミノ酸は天然の
インターフェロンのそれと対応する。133 番目のアミノ酸
はグルタミンの代わりにロイシンである。コード配列および
フランキングのステレオタイプの正確な構造は DNA 配列決定
法によって立証された。

ガンマー-インターフェロンC-10Lは自然の状態で3価が2.5という条件では、約30,000ダルトンの分子量を有する。すなわち、それは二量体の形で構成されている。SDS中の酸性条件下ではそれは約15,000ダルトンの分子量を持つ単量体である。その等電点は10.0である。

ガンマー-インターフェロンC-10Lは 8×10^7 U/0.5 mlタンパク質の比活性をもつ (EMCウイルスをもつヒトの肺の組織芽細胞腫細胞系A549で測定された)。これは完全な143番のアミノ酸のガンマー-インターフェロン0.4倍の活性を持つ。

ガンマ-インターフェロンC-10Lは、ガンマ-インタ

ここで示したガンマ-インターフェロンC-10L組み換え体は、より多くの量で、より高い活性を持つ変異体ガンマ-インターフェロンを初めて入手可能にしたものである。

—フュロンと比較して、ヒトWISH細胞で34倍高い抗癌作用を持つ。

ガンマーインターフェュロンC-10Lは、定常組織適合性抗原系(MHC)クラスIIの抗原HLA-DRの表現ヒト胎盤細胞においてガンマーインターフェュロンよりも倍多く産生させる。更に、驚くべきことに、ガンマーインターフェュロンC-10Lのそれらの細胞への受容体結合はガンマーインターフェュロンの対応する受容体結合よりも3倍強い。受容体結合は³²Pでラベルされたガンマーインターフェュロンを用いた結合実験で測定された。この実験では³²PでラベルされたガンマーインターフェュロンがラベルされていないガンマーインターフェュロンあるいはインターフェュロンC-10Lと競合する。そして逆に³²PでラベルされたガンマーインターフェュロンC-10LがラベルされていないガンマーインターフェュロンC-10Lあるいはガンマーインターフェュロンと競合する。

この重要な特性、すなわち受容体結合能では、ガンマーインターフェロンC-10Lは、Garrettらによって以前記載されたガンマーインターフェロンのうちの1つとは異なる。そのガンマーインターフェロンは、COOH末端が10個のアミノ酸分短くなっているが、この変異体は末端アミノ酸としてガンマーインターフェロンC-10Lのロイシンの代わりにグルタミンを持っており、ガンマーインターフェロンと比較して4倍高い受容体結合能を持つ。

Fig. 1

ヒト IFN- γ を用いた C-10L の タンドム 複製及び DNA の 配列

•
Not
ATG

1
GlaaspFetYrvallYsgUualGluuulontYalYstYrFbaalalaclyEiser 28
CAGACCCATACTGAAGAACGAGAAACCTTACCAATATTTAATCAGGTATTCA
179

aspvalialaspasnglythrleuwhaleodglyileleuylahstfptlysgindusar
GATGTACCGGATATCCAACTCTTTTCTTACCGATTTCAGAAATTCGAAAGACAGCT

AspArgLysXleMetGlnSerGlnIleValSer7hetYc7halYsLeu9halYalsaphe
CACACAAAATAATCCAGCCCAATTGTCTCTTTTTCCTAACTTTTTAAAACTTT

LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGlnTyrIleLysGluAspMetAsnValLys
AAGATGACTAGACCATCCAAAGAGTGTTCAGACCATCAGCAAGACATGAATGTCAAG

PhoPhaAsuSerAsnLysLysLysArgAspArgProGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTCAATACCAACAAAACAAACAGATGACTTCCAAAGCTGACTAATATTCCTG

ThraspLeuAsnValGlnArgLysAlaArgGlnLeuArgGlnValMetAlaGlnLeu
ACTGACTTGAATGTCCAGCTCAACCAATACATCAACTCATCAAGTGATGCTGAAGT

133
SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TGGCAGCAGCTAAACAGCCAGCGAAAAAGCAGCTTC TAG
574



PCT/DE 91/00944

24 23047

SECRET

Passport document issued by request received	Publication date	Passport Number document(s)	Publication date
CP-A2- 0304670	15/03/99	AD-O- 2703688 DE-A- 3730331 J-A- 1095791	16/03/99 26/03/99 13/04/99
CP-A1- 0256424	24/02/98	AD-O- 0079230 AD-O- 7080867 DE-A- 3773250 J-A- 63004908 ZA-A- 0705619	21/03/91 19/09/98 21/10/91 01/03/98 13/02/98
CP-A1- 0170917	11/02/96	AD-O- 3608122 AD-O- 0474988 J-A- 6150090 US-A- 0880031	27/07/99 16/01/98 03/02/96 06/02/99
CP-A2- 0160993	06/01/98	AD-O- 4321908 US-A- 0804499 US-A- 06/05616 VO-A- 06/05619	12/12/95 06/06/99 19/12/95 19/12/95
CP-A2- 0146354	25/06/96	AD-O- 9507072 AD-O- 3043064 J-A- 3701979 J-A- 06202999 OS-A- 7961 US-A- 4655128	14/06/99 29/06/99 03/09/91 14/10/95 20/11/95 09/08/99

For more details about this course, see detailed material of the Suriname project below, pp. 1-60.

總 經 理 處

PGT/PGP/PPG/PL

[illegible]

DATE: 10/10/2013

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	P I
C 0 7 K 3/18			
3/22			
13/00	Z N A	8517-4H	
C 1 2 N 1/21		7236-4B	
15/23			
//(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			

(72) 発明者 オットー・ベルント
 ドイツ連邦共和国 デー-3000 ハノーフ
 アー 51. ハルバーシュタット 9